

УДК 599:539.1.047

О.М. Демченко, Е.А. Дьоміна,  
Ю.І. Петунін

## КІЛЬКІСНА ОЦІНКА ХРОМОСОМНИХ ПОШКОДЖЕНЬ У ЛІМФОЦИТАХ ЛЮДИНИ ПРИ ДІЇ МАЛИХ ДОЗ $\gamma$ -ОПРОМІНЕННЯ В УМОВАХ *IN VITRO*

### Вступ

На сьогодні проблема дії малих доз радіації є найактуальнішою і в той же час найскладнішою, до кінця не вирішеною проблемою радіобіології та радіаційної медицини. Відомо, що опромінення в малих дозах індукує мутації, хромосомні аберації, які можуть призвести до загибелі або злоякісної трансформації клітин. Ініційовані радіацією сублетальні і потенційно летальні пошкодження хромосомного апарату клітин людини зберігаються тривалий час іноді навіть до дії промотора [1, 2]. Особливої гостроти проблема малих доз радіації набула у зв'язку з необхідністю оцінки і прогнозування несприятливих наслідків на здоров'я населення в результаті Чорнобильської катастрофи [3, 4].

Доведено, що опромінення в діапазоні малих доз сприяє підвищенню ризику розвитку радіогенних пухлин. При цьому невизначеність ефекту опромінення при дії малих доз зумовлена недостатністю ґрунтовних робіт у цьому напрямку, що сприяло створенню різних гіпотез щодо механізму їх дії [5, 6]. Ефекти малих доз можуть підвищуватися за рахунок епігенетичних механізмів – впливу опромінених клітин на інтактні, тому при опроміненні у цьому інтервалі вихід пошкоджень на одиницю дози може бути вищим, ніж при дії великих доз [7].

Найважливішим етапом оцінки негативних наслідків опромінення біологічних об'єктів у діапазоні малих доз є визначення характеру залежності кривих доза–ефект для різних біологічних показників, що є необхідною умовою для прогнозування генетичного та канцерогенного ризиків опромінення людини [8, 9].

На даний час безальтернативним методом оцінки величини поглиненої дози визнано використання дозових залежностей виходу радіаційно-індукованих структурних пошкоджень хромосом у лімфоцитах периферичної крові людини [10]. Саме використання культури лімфоцитів периферичної крові надає унікальну

можливість проводити дослідження безпосередньо на клітинах людини, а не вдаватися до вимушеної екстраполяції ефектів із модельних біологічних об'єктів, що часто супроводжується певними похибками. В культурі лімфоцитів периферичної крові умовно здорових донорів спонтанний рівень хромосомних аберацій невисокий і становить у середньому 1,0–1,5 % (при верхній межі 3 %). Лімфоцити є високочутливими до дії радіації клітинами як в умовах *in vivo*, так і *in vitro*, що дає можливість достовірно реєструвати індукований рівень аберацій хромосом порівняно із спонтанним при низьких рівнях опромінення. Висока мобільність лімфоцитів у кровообігу і здатність акумулювати аберації хромосом дозволяють об'єктивно оцінити радіочутливість організму в цілому [11].

### Постановка задачі

Мета статті полягає в дослідженні характеру калібрувальних кривих малі дози–ефект за рівнем і спектром радіаційно-індукованих аберацій хромосом у лімфоцитах крові умовно здорових донорів із залученням математичних моделей та врахуванням індивідуальної радіочутливості.

### Матеріали і методи

Для досліджень використовується культура лімфоцитів крові умовно здорових донорів з подальшим метафазним аналізом аберацій хромосом [12]. Інкубація клітин проводиться протягом 52 год. Для оцінки рівня і спектра структурних перебудов хромосом і визначення характеру калібрувальних кривих доза–ефект культура лімфоцитів периферичної крові опромінювалась  $\gamma$ -променями на терапевтичному апараті “Рокус”, джерелом якого є  $^{60}\text{Co}$  з потужністю дози 0,9 Гр/хв в діапазоні доз 0,1–1,0 Гр. Метафазний аналіз аберацій хромосом виконувався з елементами каріотипування.

Для більш коректної інтерпретації характеру дозових залежностей додатково визначалась індивідуальна радіаційна чутливість донорів за цитогенетичним  $G_2$ -тестом, розробленим у відділі радіобіології Інституту експериментальної онкології, патології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України [13].

Апроксимація дозових залежностей цитогенетичних ефектів, індукованих опромінен-

ням, проводилась за допомогою трьох моделей регресії:

- лінійної  $y = aD + b$ ;
- лінійно-квадратичної  $y = aD^2 + bD + c$ ;
- сплайнової  $y = \begin{cases} a_1D + b_1, & \text{якщо } D \leq D_0, \\ a_2D + b_2, & \text{якщо } D \geq D_0, \end{cases}$

де  $y$  – кількість аберацій хромосом на кожні 100 проаналізованих метафаз;  $a, b, c, a_1, a_2, b_1, b_2$  – коефіцієнти (параметри) моделей;  $D_0$  – точка переходу в моделі сплайнової регресії.

### Результати дослідження

За результатами проведених цитогенетичних досліджень (таблиця) з використанням методів обчислення коефіцієнтів лінійної, лінійно-квадратичної та сплайнової регресії, було отримано такі значення параметрів моделей:

- залежність частоти абераційних клітин ( $y$ ) від дози опромінення для першого ( $A$ ) ( $y_A$ ) і другого ( $B$ ) ( $y_B$ ) донорів:

а) лінійна модель:  $y_A = 14,465x + 1,845$ , похибка моделі  $S^2 = 1,142$ ;  $y_B = 1,42x + 3,45$ , похибка моделі  $S^2 = 4,492$ ;

б) лінійно-квадратична модель:  $y_A = 5,449x^2 + 20,655x + 0,759$ , похибка моделі  $S^2 = 0,25$ ;  $y_B = 1,12x^2 + 1,598x - 0,043$ , похибка моделі  $S^2 = 4,256$ ;

в) сплайнова модель:  $y_A = 26,855x - 1,855 - 13,224(x - 0,2)_+$ , похибка моделі  $S^2 = 0,096$ ;  $y_B = 1,558x - 1,047 - 4,539(x - 1)_+$ , похибка моделі  $S^2 = 3,019$ ;

- залежність частоти аберацій хромосом ( $y$ ) від дози опромінення для донора  $A$  ( $y_A$ ) і донора  $B$  ( $y_B$ ):

а) лінійна модель:  $y_A = 16,906x + 1,42$ , похибка моделі  $S^2 = 0,923$ ;  $y_B = 16,09x + 0,043$ , похибка моделі  $S^2 = 2,827$ ;

б) лінійно-квадратична модель:  $y_A = -5,213x^2 + 22,828x - 0,382$ , похибка моделі  $S^2 = 0,107$ ;  $y_B = 0,771x^2 + 14,87x + 0,311$ , похибка моделі  $S^2 = 2,715$ ;

в) сплайнова модель:  $y_A = 19,6x + 0,76 - 4,72(x - 0,5)_+$ , похибка моделі  $S^2 = 0,156$ ;  $y_B = 9,301x + 1,493 + 7,503(x - 0,3)_+$ , похибка моделі  $S^2 = 1,602$ ;

- залежність частоти дицентричних хромосом від дози опромінення для донора  $A$  ( $y_A$ ) і донора  $B$  ( $y_B$ ):

а) лінійна модель:  $y_A = 6,789x - 1,07$ , похибка моделі  $S^2 = 0,911$ ;  $y_B = 6,538x - 1,59$ , похибка моделі  $S^2 = 0,051$ ;

б) лінійно-квадратична модель:  $y_A = 7,268x^2 - 2,2x + 0,917$ , похибка моделі  $S^2 = 0,13$ ;  $y_B = 2,857x^2 + 2,714x - 0,571$ , похибка моделі  $S^2 = 0$ ;

в) сплайнова модель:  $y_A = 2,786x + 0,171 + 6,086(x - 0,5)_+$ , похибка моделі  $S^2 = 0,058$ ;  $y_B = 5x - 1 + 2(x - 0,5)_+$ , похибка моделі  $S^2 = 0$ ;

На рис. 1–6 наведено графіки залежності виходу радіаційно-індукованих аберацій хромосом у діапазоні доз 0,1–1,0 Гр, де  $x$  – доза опромінення,  $y$  – цитогенетичний показник,  $S^2$  – залишкова сума квадратів (похибка моделі).

Аналіз характеру калібрувальних кривих доза–ефект, отриманих для донорів  $A$  і  $B$ , які побудовані за допомогою вказаних вище моделей, показав, що їх характер ідентичний. Це підтверджується результатами виконаного  $G_2$ -assay в обох донорів при тестуючому  $\gamma$ -опроміненні у  $G_2$ -періоді мітотичного циклу в дозі 1,5 Гр – вихід делецій становить 24/100 проаналізованих клітин, що свідчить про схожу

**Таблиця.** Частота хромосомних пошкоджень при тестуючому опроміненні лімфоцитів у діапазоні доз 0,1–1,0 Гр

Донор	Доза, Гр	Частота абераційних клітин, %	Сума аберацій хромосом/100 клітин	Частота дицентриків/100 клітин
<i>A</i>	0,1	2,5	2,5	0
	0,2	5	5	0,6
	0,3	6,6	6,6	1,2
	0,5	9,5	10,5	1,5
	1,0	16	18	6
<i>B</i>	0,1	2,5	2,5	0
	0,2	3,2	3,2	0
	0,3	3,5	4,5	0,5
	0,5	7	7	1,5
	1,0	16	17	5

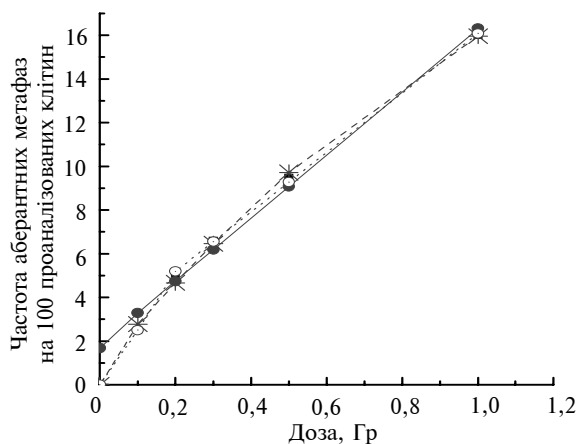


Рис. 1. Дозова залежність частоти аберантних клітин для донора А: ■ — експериментальні дані; ● — лінійна модель; \* — лінійно-квадратична модель; ○ — сплайнова модель

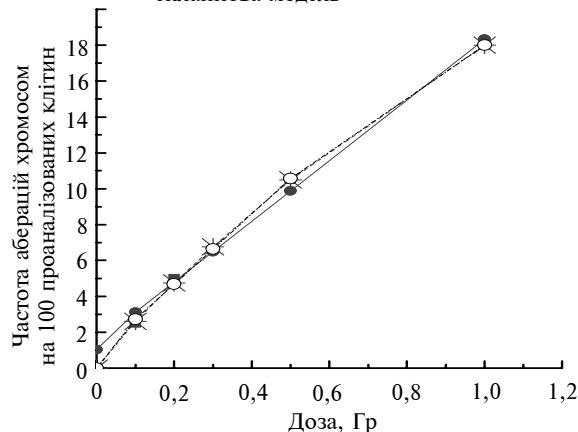


Рис. 2. Дозова залежність суми аберацій хромосом для донора А: ■ — експериментальні дані; ● — лінійна модель; \* — лінійно-квадратична модель; ○ — сплайнова модель

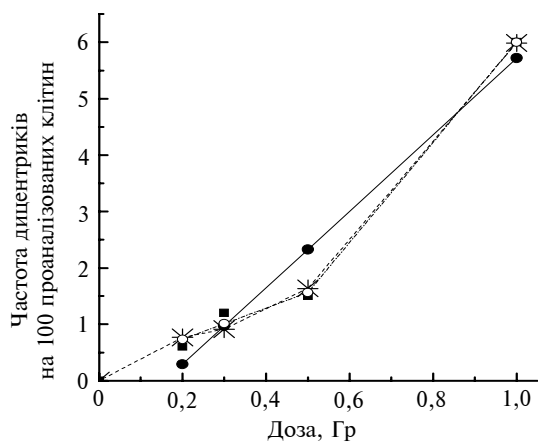


Рис. 3. Дозова залежність дицентричних хромосом для донора А: ■ — експериментальні дані; ● — лінійна модель; \* — лінійно-квадратична модель; ○ — сплайнова модель

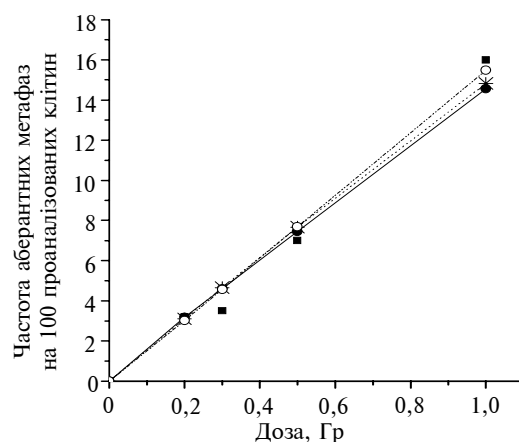


Рис. 4. Дозова залежність частоти аберантних клітин для донора В: ■ — експериментальні дані; ● — лінійна модель; \* — лінійно-квадратична модель; ○ — сплайнова модель

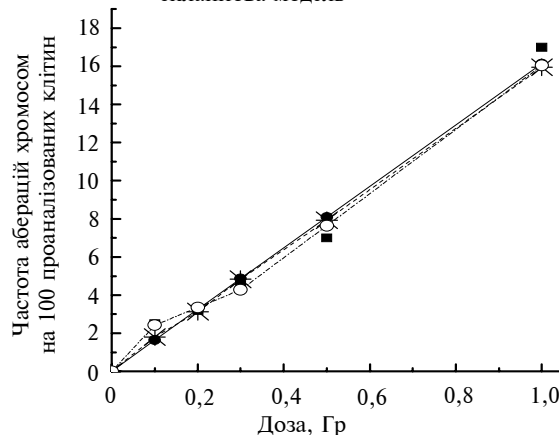


Рис. 5. Дозова залежність суми аберацій хромосом для донора В: ■ — експериментальні дані; ● — лінійна модель; \* — лінійно-квадратична модель; ○ — сплайнова модель

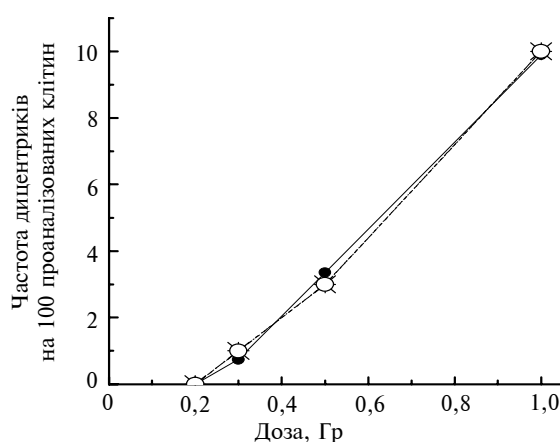


Рис. 6. Дозова залежність дицентричних хромосом для донора В: ■ — експериментальні дані; ● — лінійна модель; \* — лінійно-квадратична модель; ○ — сплайнова модель

індивідуальну радіочутливість обстежених донорів. Для характеру кривих виходу радіаційно-індукованих аберацій хромосом характерна перевага лінійної компоненти, що підтверджується значенням  $\alpha$ -коефіцієнта моделі лінійної регресії. Вихід обмінних аберацій – дицентричних хромосом, які, як відомо, є маркерами променевої дії на організм людини, апроксимується лінійно-квадратичною залежністю, що пов'язано з двоударним механізмом їх утворення. У діапазоні доз 0,1–0,3 Гр крива для дицентричних хромосом має плато – дозозалежну ділянку, але з подальшим підвищенням дози до 1,0 Гр рівень дицентричних хромосом закономірно зростає. Можна стверджувати, що в інтервалі доз 0,1–0,3 Гр опромінення за такими показниками, як дицентричні хромосоми (об'єктивні променеві маркери), складно визначити величину поглиненої дози.

Утворення плато на калібрувальній кривій пояснюються дослідниками по-різному: неоднорідністю клітинних популяцій [14] включенням різних систем репарацій хромосомних пошкоджень, наприклад адаптаційної репарації чи SOS-репарації, яка активується в результаті зростання генетичних пошкоджень при переході на плато [15, 16]. Є й інші точки зору на цю проблему. Проведений аналіз калібрувальних кривих доза–ефект, побудованих за допомогою моделі сплайнової регресії, порівняно з лінійною і лінійно-квадратичною показав, що дозові залежності мають подібну форму, але калібрувальні криві з найбільшою точністю апроксимуються за допомогою моделі сплайнової регресії, оскільки похибка цієї моделі має найменше значення для всіх цитогенетичних показників обстежених донорів. Похибка визначається остаточною сумою квадратів отриманих у резуль-

таті порівняння експериментальних та розрахункових даних: чим менша остаточна сума квадратів, тим точніша модель [17]. Наприклад, для донора А (див. рис. 1) похибка  $S^2$  частоти абераційних клітин для лінійної моделі становить  $S^2 = 1,142$ ; для лінійно-квадратичної моделі  $S^2 = 0,25$ , тоді як для моделі сплайнової регресії  $S^2 = 0,096$ ; для дицентриків (див. рис. 3) – 0,911, 0,13 і 0,058, відповідно. Отже, для біологічної (цитогенетичної) дозиметрії модель сплайнової регресії має більшу перевагу порівняно з традиційними моделями, які використовуються в радіобіології (лінійною і лінійно-квадратичною). Таким чином, результати виконаного дослідження спрямовані на вдосконалення біологічної (цитогенетичної) дозиметрії променевих уражень людини.

### Висновки

Для кількісної оцінки утворення хромосомних пошкоджень і побудови стандартних калібрувальних дозових кривих на основі цитогенетичних показників в опромінених лімфоцитах крові людини доцільно використовувати модель сплайнової регресії.

При однаковій індивідуальній радіаційній чутливості донорів, визначеної за  $G_2$ -тестом, дозові залежності мають подібну форму, тобто їх характер ідентичний.

З врахуванням актуальності проблеми малих доз опромінення і пов'язаної з ними масштабності медичних наслідків Чорнобильської катастрофи отримані результати можуть бути використані для подальшого вдосконалення і стандартизації калібрувальних кривих з метою об'єктивної оцінки поглинених доз іонізуючого випромінювання.

Е.Н. Демченко, Э.А. Демина, Ю.И. Петунин

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ХРОМОСОМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ В ЛИМФОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ МАЛЫХ ДОЗ  $\gamma$ -ОБЛУЧЕНИЯ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

В исследовании изучено влияние  $\gamma$ -лучей в диапазоне малых доз на генетический аппарат человека. Подтверждается наличие плато в области 0,1–0,3 Гр для лучевых маркеров – дицентрических хромосом. Показано, что радиационно-

O.M. Demchenko, E.A. Dyomina, Yu.I. Petunin

THE QUANTITATIVE ASSESSMENT OF CHROMOSOMAL DAMAGES IN HUMAN LYMPHOCYTES AT THE ACTION OF LOW DOSES OF  $\gamma$ -RADIATION IN CONDITIONS IN VITRO

The study addresses the effect of  $\gamma$ -rays in a low dose range on the genetic apparatus. Our experimental results show the presence of the plateau in the dose range of 0,1–0,3 Gy for radiation markers – dicentric chromosomes. We prove that the best ap-

индуцированные цитогенетические эффекты наилучшим образом аппроксимируются с помощью модели сплайновой регрессии. С целью интерпретации характера дозовых кривых на основе цитогенетических показателей целесообразно учитывать индивидуальную радиочувствительность человека ( $G_2$ -assay).

proximation of radiation induced cytogenetic effect can be reached by applying the regression spline model. To interpret the dose curves character adequately according to the obtained cytogenetic parameters, we take into account human individual radiation sensitivity.

1. *Biological dosimetry: chromosomal aberrations analysis for dose assessment. Technical. Reports series № 260.* — Vienna: IAEA, 1986. — 69 p.
2. *Бариляк І.Р., Дьоміна Е.А.* Біологічна індикація та дозиметрія за частотою нестабільних аберацій хромосом у лімфоцитах людини // *Цитология и генетика.* — 2004. — № 4. — С. 72–85.
3. *Севаньяев А.В.* Современное состояние вопроса количественной оценки цитогенетических эффектов в области низких доз радиации // *Радиобиология.* — 1991. — **31**, № 4. — С. 600–605.
4. *Демина Э.А.* Кривые доза–эффект при гамма-воздействии в различных стадиях митотического цикла культуры лимфоцитов человека // *Там же.* — 1987. — **27**, № 3. — С. 428.
5. *Кузин А.М.* Проблема малых доз и идеи гормезиса в радиобиологии // *Там же.* — 1991. — **31**, № 1. — С. 16–21.
6. *Готлиб В.Я., Пелевина И.И., Конопля Е.Ф. и др.* Некоторые аспекты биологического действия малых доз радиации // *Там же.* — 1991. — **31**, № 3. — С. 318–325.
7. *Радиация и патология: Учеб. пос. / А.Ф. Цыб, Р.С. Будагов и др.* — М.: Высш. шк., 2005. — 342 с.
8. *Гераськин С.А., Севаньяев А.В.* Цитогенетические эффекты малых доз: результаты Н.В. Лучника и современное состояние вопроса // *Радиобиология.* — 1996. — **36**, № 6. — С. 860–864.
9. *Шмакова Н.Л., Фадеева Т.А., Красавин Е.А.* Действие малых доз облучения на клетки китайского хомячка // *Там же.* — 1998. — **38**, № 6. — С. 841–847.
10. *Пикалова Л.В.* Применение цитогенетических методов исследования хромосом в радиобиологии // *Молекулярная биология.* — 2007. — **9**. — С. 160–168.
11. *Севаньяев А.В.* Радиочувствительность хромосом лимфоцитов человека в митотическом цикле. — М.: Энергоатомиздат, 1987. — 160 с.
12. *Дьоміна Е.А., Дружина М.О., Рябченко Н.М.* Індивідуальна радіочутливість людини. — К.: Логос, 2006. — 126 с.
13. *Дьоміна Е.А., Рябченко Н.М., Дружина М.О., Чехун В.Ф.* Цитогенетичний спосіб ( $G_2$ -assay) визначення індивідуальної радіочутливості людини з метою первинної профілактики радіогенного раку: Метод. рекомендації. — К.: Логос, 2007. — 28 с.
14. *Lloyd D.C., Edwards A.A., Lönard A. et al.* Frequencies of chromosomal aberrations induced in human blood lymphocytes by low doses of X-rays. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* — 1988. — **53** (1). — P. 49–55.
15. *Luchnik N.V., Fesenko E.V., Ovchinnikova V.G.* Critical periods of the mitotic cycle: influence of aminopterin and thymidine on production of chromosomal aberrations by radiation in *Crepis capillaris* // *Mutat. Res.* — 1976. — **34** (3). — P. 367–388.
16. *Спитковский Д.М., Ермаков А.В., Горин А.И. и др.* Особенности внепланового синтеза ДНК и изменений структурных параметров ядер лимфоцитов человека после действия рентгеновского излучения в малых дозах и в сочетании с УФ-облучением // *Радиационная биология. Радиоэкология.* — 1994. — **34**, № 1. — С. 23–30.
17. *Клюшин Д.А., Петунин Ю.И.* Доказательная медицина: Применение статистических методов. — М.: Диалектика. — 2008. — 316 с.